6 月 June
2020, 63(6): 769 - 778
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: // www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2020. 06. 013

基于 mtCOI 基因序列的中国葱斑潜蝇不同地理种群遗传多样性分析

钟裕俊[1,2], 杜素洁[2], 潘立婷[2], 王玉生[2], 王福莲[1,*], 刘万学[2,*]

(1. 长江大学农学院, 长江大学昆虫研究所, 湖北荆州 434025; 2. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要:【目的】葱斑潜蝇 *Liriomyza chinensis* 是葱蒜类蔬菜上的重要经济害虫,在我国广泛分布。本研究旨在阐析中国葱斑潜蝇的地理种群遗传分化。【方法】以中国 8 省 12 个不同地理种群的 253 头葱斑潜蝇为样本,测定其 mtCOI 基因序列;依据获得的 mtCOI 基因序列,利用 MEGA7.0, DnaSP 6.1 和 Arlequin 3.5 等软件对葱斑潜蝇地理种群的遗传多样性、基因流水平和遗传变异等进行分析。【结果】在 253 头个体的 759 bp mtCOI 基因片段中,获得 13 个单倍型,各单倍型间 K2P 遗传距离均小于 0.02;其中单倍型 Hap1 为 12 个地理种群所共享,总发生频率高达 81.82%。总群体单倍型多样性较低(Hd = 0.327),核苷酸多样性(Pi)为 0.00159,核苷酸平均差异数(K)为 1.21011;葱斑潜蝇总群体遗传分化程度中等(F_{ST} = 0.06971),基因交流较充分(Nm = 3.33629)。分子方差分析(AMOVA)结果表明,遗传变异来源为群体内;总群体 Tajima's D 检验值为显著负值;Mantel 检测结果说明种群间的遗传距离与地理距离没有相关性。【结论】中国葱斑潜蝇地理种群的遗传多样性较低,基因交流较充分,遗传分化程度中等,且地理距离并不影响其遗传分化程度;葱斑潜蝇总群体在较近的历史时期未经历明显的种群扩张和种群增长。

关键词: 葱斑潜蝇; 线粒体 COI 基因; 地理种群; 遗传多样性; 系统进化分析

中图分类号: Q969 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2020)06-0769-10

Analysis of the genetic diversity of geographical populations of *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agromyzidae) in China based on mtCOI gene sequence

ZHONG Yu-Jun[1,2], DU Su-Jie[2], PAN Li-Ting[2], WANG Yu-Sheng[2], WANG Fu-Lian[1,*], LIU Wan-Xue[2,*] (1. Institute of Entomological Science, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract:【Aim】*Liriomyza chinensis*, a serious economic pest of onions and garlics, is widely distributed in China. This study aims to analyze the genetic differentiation among the geographical populations of *L. chinensis* in China.【Methods】A total of 253 individuals from 12 different geographical populations from 8 provinces were used as samples, and their mtDNA COI gene was sequenced. The genetic diversity, gene flow levels and genetic variation of the geographical populations of *L. chinensis* were analyzed by MEGA7.0, DnaSP 6.1 and Arlequin 3.5 based on the obtained mtCOI gene sequences.【Results】From the 253 individuals 13 haplotypes of the mtCOI gene fragment of 759 bp in

---

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772236); 中国农业科学院科技创新工程项目(caascx-2017-2022-IAS)
作者简介: 钟裕俊, 男, 1994 年 8 月生, 浙江义乌人, 硕士研究生, 研究方向为入侵害虫防控, E-mail: 1114127319@qq.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: liuwanxue@caas.cn; wangfl_hb@163.com
收稿日期 Received: 2019-11-17; 接受日期 Accepted: 2020-02-24

length were defined, and the K2P genetic distance between haplotypes was less than 0.02. Haplotype Hap1 was shared by the 12 geographical populations, and the total occurrence frequency was up to 81.82%. The haplotype diversity (*Hd*) of all geographical populations was low (0.327), the nucleotide diversity (*Pi*) was 0.00159, and the average number of nucleotide difference (*K*) was 1.21011. The total population had generated moderate genetic differentiation (F_{ST} = 0.06971), and the gene flow was relatively sufficient (*Nm* = 3.33629). The results of molecular variance analysis (AMOVA) showed that the source of genetic variation was within population, and the Tajima's *D* test value was significantly negative. Mantel test results showed that the genetic distance was not related to the geographical distance. 【Conclusion】The geographical populations of *L. chinensis* in China show low genetic diversity, relatively sufficient gene flow and moderate genetic differentiation, and the geographical distance does not affect the degree of genetic differentiation between geographical populations. The total population of *L. chinensis* has not experienced significant population expansion and population growth in the recent historical period.

Key words: *Liriomyza chinensis*; mtDNA COI gene; geographical population; genetic diversity; phylogenetic analysis

葱斑潜蝇 *Liriomyza chinensis* 隶属双翅目(Diptera)潜蝇科(Agromyzidae)斑潜蝇属 *Liriomyza*,是一种非常重要的潜叶蝇类害虫,主要为害大葱 *Allium fistulosum*、韭菜 *A. tuberosum*、洋葱 *A. cepa* 等百合科(Liliaceae)葱属 *Allium* 植物,以大葱受害最重(Spencer, 1973; 康乐, 1996)。其幼虫、成虫均可为害,主要以幼虫潜食叶肉为主,叶肉被取食后,仅剩两层表皮,呈现白色线状条斑,形成潜道,严重影响植物正常的光合作用;并且雌成虫的产卵器可刺破叶片,由此造成的机械损伤为病原物侵入提供了重要途径(潘秀美和姜官恒, 2001; 魏国先等, 2001)。葱斑潜蝇广泛分布于东南亚和太平洋地区,在中国、日本、韩国、印度尼西亚、新加坡、朝鲜、越南等国家危害严重(Tran and Takagi, 2005; Tran *et al.*, 2007),近年来该虫也在欧洲部分地区如法国、德国等地暴发成灾(Martynov *et al.*, 2016)。该虫在我国大部分地区均具有较高的适应性(梁超峰等, 2018),主要分布于黑龙江、内蒙古、辽宁、沈阳、山东、河北、河南、山西、福建、台湾等省区(王永卫等, 1992; 王进忠等, 2000; Shiao, 2004)。葱斑潜蝇的温度适应范围广,单雌产卵量大,在我国各地一年发生 4~7 代不等,如东北 4~5 代,山东 6~7 代,且世代重叠发生(王立霞等, 2000; 潘秀美和姜官恒, 2001),有春季和秋季两个发生高峰期,高峰期易在大葱种植区暴发成灾(潘秀美和姜官恒, 2000; 王立霞等, 2000; Tran *et al.*, 2007)。

大葱作为葱斑潜蝇的主要寄主植物,其大规模化面积种植一定程度上有利于葱斑潜蝇的严重发生。据 2014 年农业农村部种植业管理司的统计结果,我国大葱种植面积已逾 57.3 万 hm^2,主产区位于秦岭淮河以北的广大地区,涵盖华北平原、东北平原和黄土高原三大主产区,其中华北平原的山东、河南和河北三省为我国大葱的第一大产区,总栽培面积占全国的 36%,总产量占全国的 51%(彭帅等, 2017)。山东省作为我国葱蒜类蔬菜种植面积最大的省份,2001 年葱蒜类蔬菜种植面积约 26.7 万 hm^2,其 80% 的面积遭受葱斑潜蝇的危害,被害株率常达 40% 以上(潘秀美和姜官恒, 2001)。傅苏友和苏保乐(2011)在调查山东潍坊市的葱斑潜蝇发生情况时,发现其在大葱上为害严重,一株葱上幼虫平均为 7 头,被害株高达 70%~80%,严重的达到 100%。

目前有关葱斑潜蝇的研究多局限于生物学特性、发生规律等基础性研究,而有关葱斑潜蝇的种群遗传多样性、种群扩张等方面研究还暂未见报道。葱斑潜蝇作为一种本地害虫,相对于斑潜蝇属的其他入侵种,如南美斑潜蝇 *L. huidobrensis*、美洲斑潜蝇 *L. sativae*、三叶草斑潜蝇 *L. trifolii* 等,其长期累积的遗传变异是否与其严重危害存在联系,还尚不清楚。分子标记技术的快速发展,很大程度加快了国内外学者对斑潜蝇属害虫遗传分化的研究。Morgan 等(2000)首先对美国加利福尼亚中部和南部的南美斑潜蝇种群间进行 RAPD-PCR 检测,发现南美斑潜蝇种群间的遗传变异主要来源于地理分布。王莉萍等(2007)利用 rDNA-ITS1 标记对我国 8 个不同地理的美洲斑潜蝇种群进行分析,得出各地

理种群之间的遗传分化很小，且遗传分化很有可能与地理分布有关。本研究选用线粒体 COI 基因作为分子标记，以我国 8 省 12 个不同地区的葱斑潜蝇种群为研究对象，对不同地理种群的遗传多样性、遗传分化程度、基因交流等进行了分析，以揭示其种群系统发育地理格局与演变机制。研究结果对葱斑潜蝇的种群遗传动态分析、种群扩张机制探讨具有一定的指导意义，同时也为制定葱斑潜蝇的防治策略提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

葱斑潜蝇标本于 2016－2018 年采集自中国 8 省 12 个地点（表 1），采用五点取样法，采集露天种植的优势寄主植物大葱 *A. fistulosum* 和小葱 *A. ascalonicum*，采集虫态为幼虫或蛹，带回实验室饲养。待虫源羽化后，浸于无水乙醇中，－40℃保存备用。

表 1　葱斑潜蝇不同地理种群的采集信息

Table 1　Collecting data of different geographical populations of *Liriomyza chinensis*

种群 Population	采集地点 Sampling locality	经纬度 Latitude and longitude	采集时间（年.月） Sampling date (year. month)	寄主植物 Host plants	样本数量 Number of samples
JLTH	吉林通化 Tonghua, Jilin	41°46′N, 125°54′E	2018.07	小葱 *Allium ascalonicum*	20
BJHD	北京海淀 Haidian, Beijing	40°01′N, 116°16′E	2017.07/2018.09	小葱 *A. ascalonicum*	21
NMWH	内蒙古乌海 Wuhai, Inner Mongolia	39°48′N, 106°46′E	2017.08	小葱 *A. ascalonicum*	10
HBBD	河北保定 Baoding, Hebei	38°51′N, 115°35′E	2017.05/2017.07	大葱 *A. fistulosum*	20
HBSJZ	河北石家庄 Shijiazhuang, Hebei	37°58′N, 114°26′E	2017.05/2018.09	小葱 *A. ascalonicum*	20
SDWF	山东潍坊 Weifang, Shandong	37°49′N, 117°29′E	2017.09	大葱 *A. fistulosum*	21
SDYT	山东烟台 Yantai, Shandong	37°38′ N, 120°28′ E	2016.07/2017.05	大葱 *A. fistulosum*	26
SDJN	山东济南 Jinan, Shandong	37°08′N, 117°06′E	2017.05/2017.07	大葱 *A. fistulosum*	20
SDLY	山东临沂 Linyi, Shandong	36°18′N, 119°50′E	2018.09	小葱 *A. ascalonicum*	20
GSBY	甘肃白银 Baiyin, Gansu	36°22′N, 104°18′E	2018.08	大葱 *A. fistulosum*	23
HNXC	河南许昌 Xuchang, Henan	33°52′N, 113°28′E	2018.01	大葱 *A. fistulosum*	24
HNLS	海南陵水 Lingshui, Hainan	18°28′N, 110°04′E	2018.02	小葱 *A. ascalonicum*	28

1.2　基因组 DNA 提取

参照 De Barro 和 Driver（1997）的快速研磨法，并稍作改动。具体步骤如下：从标本管中取单头葱斑潜蝇雌成虫，置于干净滤纸上，待无水乙醇挥发后，吸取 10 μL 裂解液（0.05 mol/L Tris-HCl，pH 8.4，50 mmol/L KCl，0.45% Tween-20，0.45% NP 40，0.2% Gelatin，80 μg/mL 蛋白酶 K）滴于封口膜上，用灭菌过的 0.2 mL PCR 管管底充分研磨虫体，将提取液吸入 0.2 mL PCR 管中。吸取 20 μL 裂解液清洗 PCR 管底和封口膜 2 次，最后将清洗液吸入 0.2 mL PCR 管中。将提取液进行金属浴，程序：65℃下 30 min，25℃ 下 2 min，96℃ 下 10 min，灭活蛋白酶 K，最终获得 50 μL 的葱斑潜蝇 DNA，保存在－20℃冰箱中备用。

1.3 mtCOI 基因序列的扩增

采用引物组合 C1-J-2183 (5′-CAACATTTATTTTGATTTTTTGG-3′) 和 TL2-N-3014 (5′-TCCATTGCACTAATCTGCCATATTA-3′) (Simon *et al.*, 1994) 扩增葱斑潜蝇 mtCOI 基因的目的片段。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

PCR 反应体系(25 μL): 10 × buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L)0.4 μL, 正反引物(10 pmol/L)各 0.4 μL, *Taq* 酶(2.5 U/μL) 0.2 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH_2O 20.1 μL。PCR 反应程序: 95℃预变性 4 min; 95℃变性 1 min, 52.5℃退火 50 s, 72℃延伸 90 s, 35 个循环; 继续 72℃延伸 10 min。取 20 μL 扩增产物在含有 GoldView Ⅱ 的 1% 琼脂糖凝胶上以 110 V 电泳分离 30 min,然后以凝胶成像系统分析电泳结果并拍照保存。

1.4 PCR 产物的纯化及克隆测序

由于部分虫源直接测序时出现重叠峰,为了确保测序的准确性,对存在重叠峰的样品进行了克隆测序。在紫外灯下切下含有目的片段的明亮条带,使用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒将 PCR 产物回收纯化。将纯化产物与克隆质粒 pEASY-T3 Cloning Vector 连接,转化到 Trans1-T1 感受态细胞内,筛选阳性单克隆进行菌落 PCR 检测,之后送到上海生工生物工程股份有限公司进行双向测序。

1.5 序列整理及数据分析

首先将正反向引物测得的序列导入 MEGA 7.0 软件(Kumar *et al.*, 2016)中,结合峰图识别软件 Chromas 2.6 校正序列,再进行多序列比对。利用 NCBI 数据库对获得的序列进行 BLAST 比对分析,以确定扩增的基因序列来自线粒体 COI 基因。

利用 MEGA 7.0 软件(Kumar *et al.*, 2016)对葱斑潜蝇 mtCOI 基因序列进行变异分析,计算变异位点数、简约信息位点数、碱基组成等信息。同时,基于 Kimura-2-Parameter(K2P)模型,以美洲斑潜蝇 *L. sativae*、南美斑潜蝇 *L. huidobrensis*、三叶草斑潜蝇 *L. trifolii*、番茄斑潜蝇 *L. bryoniae* 和豌豆彩潜蝇 *Chromatomyia horticola* 的相应序列为外群,采用非加权组平均(UPGMA)法构建单倍型系统发育树,系统树各分支的置信度(bootstrap)均进行 1 000 次重复检验。利用 DnaSP 6.1 软件(Rozas *et al.*, 2017)对不同地理种群的葱斑潜蝇进行单倍型多样性(*Hd*)、核苷酸多样性(*Pi*)和 Tajima's *D* 中性检验等分析。应用 Network 4.6 基于 Median-joining 算法构建单倍型间的网络关系图。

应用 Arlequin 3.5 软件(Excoffier and Lischer, 2010)计算种群间的遗传分化系数(F_{ST})(Hudson *et al.*, 1992)、遗传距离[$F_{ST}/(1-F_{ST})$]、基因流(*Nm*)等参数;并进行分子方差分析(AMOVA),计算遗传变异在种群间和种群内的方差贡献率。

根据采集地经纬度计算出成对种群间的地理距离,同时结合遗传分化系数(F_{ST}),用 TFPGA 软件(Miller, 1997)中的 Mantel 算法检测不同种群间的遗传距离和地理距离的相关性,进行 10 000 次置换,并做显著性检验。

2 结果

2.1 葱斑潜蝇线粒体 COI 基因的碱基组成及单倍型分布

将中国葱斑潜蝇 12 个地理种群共 253 条 mtCOI 基因序列比对、剪切后得到 759 bp 的片段,分析表明,无碱基的插入或缺失,具明显的 A/T 碱基偏倚性,A + T 平均含量为 70.3%;序列共有 20 个变异位点,占碱基总数的 2.64%,包括 13 个单变异多态性位点和 7 个简约信息位点。

单倍型的数量及其分布和频次的结果显示(表 2),供试种群中共发现 13 种单倍型 Hap1 – Hap13 (GenBank 登录号: MN700917 – MN700929),包括 7 个共享单倍型(Hap1, Hap3, Hap6, Hap8 – Hap11),其余 6 个单倍型为相应地理种群独享单倍型,其中 Hap2 属于北京海淀种群(BJHD), Hap4 和 Hap5 属于甘肃白银种群(GSBY), Hap7 属于海南陵水种群(HNLS), Hap12 和 Hap13 属于吉林通化种群(JLTH)。Hap1 出现频率最高,占总样本的 81.82%,且分布最广,为所有地理种群共有,其余 12 种单倍型出现频率均较低(≤3.95%)。各地理种群中,吉林通化种群(JLTH)的单倍型种类最多(5 种),其次为河北石家庄种群(HBSJZ)、河南许昌种群(HNXC)和山东济南种群(SDJN)有 4 种,而河北保定种群(HBBD)与内蒙乌海种群(NMWH)仅有 1 种单倍型。

2.2 葱斑潜蝇种群的遗传多样性及中性检验

葱斑潜蝇各种群 mtCOI 基因单倍型多样性(*Hd*)、核苷酸多样性(*Pi*)、核苷酸平均差异数(*K*)、Tajima's *D* 中性检测分析结果显示(表 2),总群体单倍型多样性(*Hd*)为 0.327,核苷酸多样性(*Pi*)为 0.00159, 核苷酸平均差异数(*K*)为 1.21011, 中性检验结果不显著(Tajima's *D* =

表 2　葱斑潜蝇 12 个不同地理种群基于 mtCOI 基因序列的遗传多样性分析及中性检验

Table 2　Genetic diversity and neutrality test of *Liriomyza chinensis* among 12 geographical populations based on mtCOI gene sequence

种群 Population	单倍型数 Haplotype number	种群单倍型组成(个体数) Haplotype composition within population (number of individuals)	单倍型多样性 Haplotype diversity *Hd*	核苷酸多样性 Nucleotide diversity *Pi*	核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide difference *K*	Tajima'*D* 中性检验 Tajima'*D* neutrality test
JLTH	5	Hap1 (8), Hap8 (2), Hap11 (4), Hap12 (5), Hap13 (1)	0.763	0.00716	5.43684	0.50355
BJHD	3	Hap1 (19), Hap2 (1), Hap3 (1)	0.186	0.00132	1.00000	-1.25759
NMWH	1	Hap1 (10)	0	0	-	-
HBBD	1	Hap1 (20)	0	0	-	-
HBSJZ	4	Hap1 (14), Hap8 (1), Hap9 (1), Hap10 (4)	0.489	0.0015	1.13684	-1.89783 *
SDWF	2	Hap1 (20), Hap10 (1)	0.095	0.00013	0.09524	-1.16356
SDYT	3	Hap1 (24), Hap10 (1), Hap11 (1)	0.151	0.00111	0.84615	-2.34784 **
SDJN	4	Hap1 (17), Hap3 (1), Hap6 (1), Hap10 (1)	0.284	0.00092	0.70000	-2.12144 **
SDLY	3	Hap1 (16), Hap10 (3), Hap11 (1)	0.353	0.00167	1.26842	-2.09572 **
GSBY	3	Hap1 (21), Hap4 (1), Hap5 (1)	0.170	0.00023	0.17391	-1.51496 *
HNXC	4	Hap1 (15), Hap3 (1), Hap9 (6), Hap11 (2)	0.562	0.00315	2.38768	-1.43315 *
HNLS	3	Hap1 (23), Hap6 (4), Hap7 (2)	0.315	0.00043	0.32540	-0.76753
总计 Total	12	Hap1 - Hap13	0.327	0.00159	1.21011	-1.64799

Hap1 - Hap13：单倍型 Haplotypes. 单倍型后括号内的数字为具有该单倍型的个体数。The numbers in brackets after haplotype are the number of individuals with this haplotype. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

-1.64799, $P>0.05$),说明供试葱斑潜蝇总群体在过去较近的一段历史时期内未经历明显的群体扩张和持续增长模式,群体大小保持相对稳定状态。各地理种群单倍型多样性(*Hd*)在 0 ~ 0.763 间,核苷酸多样性(*Pi*)在 0 ~ 0.00716 间,核苷酸平均差异数在 0.09524 ~ 5.43684 间,吉林通化种群(JLTH)的单倍型多样性最高(*Hd* = 0.763),其次是河南许昌种群(HNXC, *Hd* = 0.562)和河北石家庄种群(HBSJZ, *Hd* = 0.489),而河北保定种群(HBBD, *Hd* = 0)和内蒙乌海种群(NMWH, *Hd* = 0)遗传多样性最低。各种群间的 Tajima's *D* 中性检测分析结果表明,甘肃白银种群(GSBY)、河北石家庄种群(HBSJZ)和河南许昌种群(HNXC)表现显著,山东济南种群(SDJN)、山东临沂种群(SDLY)和山东烟台种群(SDYT)表现极显著,说明这 6 个地区的葱斑潜蝇种群在较近的历史时期经历了种群扩张,而其他地区的群体表现均不显著。

2.3　葱斑潜蝇 mtCOI 基因单倍型遗传距离及系统进化分析

遗传分化的结果显示(表 3),各单倍型间的 K2P 遗传距离范围为 0.001 ~ 0.020,单倍型 Hap11 与其他单倍型遗传距离最大,遗传距离达到了 0.012 ~ 0.020;其次是单倍型 Hap2, Hap3, Hap8 和 Hap13,这 4 个单倍型与其他单倍型之间的遗传距离在 0.003 ~ 0.019 之间;其余 7 个单倍型之间遗传距离均很接近(≤0.003)。

从葱斑潜蝇 mtCOI 基因单倍型系统发生树可见(图 1),葱斑潜蝇 13 种单倍型中,Hap11 单独形成一支系,其他 12 种单倍型聚为另一支系。这 12 种单倍型聚成的大支又可分为两小支系,第一小支包含 Hap2, Hap3, Hap8 和 Hap13 共 4 个单倍型,第二小支系包含 Hap1, Hap4 - Hap7, Hap9 - 10 及 Hap12 共 8 种单倍型。

为了进一步直观体现出葱斑潜蝇 mtCOI 基因单倍型之间的遗传分化及在种群中的分布频率,构建 13 种单倍型的 Network 网络关系图(图 2)。结果显示,以单倍型 Hap1 为中心,其他单倍型均围绕这一单倍型呈星形辐射分布状,据此推测分布广泛且分布频次最高的 Hap1 为祖先单倍型。

2.4　不同地理种群间的遗传分化、基因交流和分子方差分析

葱斑潜蝇总群体的基因流(*Nm*)为 3.33629, 遗

表 3　基于葱斑潜蝇地理种群 mtCOI 基因序列不同单倍型的遗传距离

Table 3　Genetic distances of different haplotypes of *Liriomyza chinensis* geographical populations based on mtCOI gene sequence

单倍型 Haplotype	Hap1	Hap2	Hap3	Hap4	Hap5	Hap6	Hap7	Hap8	Hap9	Hap10	Hap11	Hap12	Hap13
Hap1		0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.001	0.003	0.001	0.001	0.004	0.001	0.003
Hap2	0.008		0.001	0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.004	0.005	0.003	0.002
Hap3	0.007	0.001		0.003	0.003	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.005	0.003	0.001
Hap4	0.001	0.007	0.005		0.002	0.002	0.002	0.003	0.002	0.002	0.004	0.002	0.003
Hap5	0.001	0.007	0.008	0.003		0.002	0.002	0.004	0.002	0.002	0.004	0.002	0.003
Hap6	0.001	0.009	0.008	0.003	0.003		0.002	0.004	0.002	0.002	0.005	0.002	0.003
Hap7	0.001	0.007	0.005	0.003	0.003	0.003		0.003	0.002	0.002	0.005	0.002	0.003
Hap8	0.009	0.004	0.003	0.008	0.011	0.011	0.008		0.004	0.004	0.005	0.004	0.001
Hap9	0.001	0.009	0.008	0.003	0.003	0.003	0.003	0.011		0.002	0.004	0.002	0.003
Hap10	0.001	0.009	0.008	0.003	0.003	0.003	0.003	0.011	0.003		0.005	0.002	0.004
Hap11	0.013	0.016	0.017	0.012	0.012	0.015	0.015	0.020	0.015	0.015		0.004	0.005
Hap12	0.001	0.009	0.008	0.003	0.003	0.003	0.003	0.011	0.003	0.003	0.015		0.004
Hap13	0.008	0.003	0.001	0.007	0.009	0.009	0.007	0.001	0.009	0.009	0.019	0.009	

对角线以下为遗传距离平均值，对角线以上为标准误。Data below the diagonal are means of the genetic distance and those above the diagonal are the standard error.

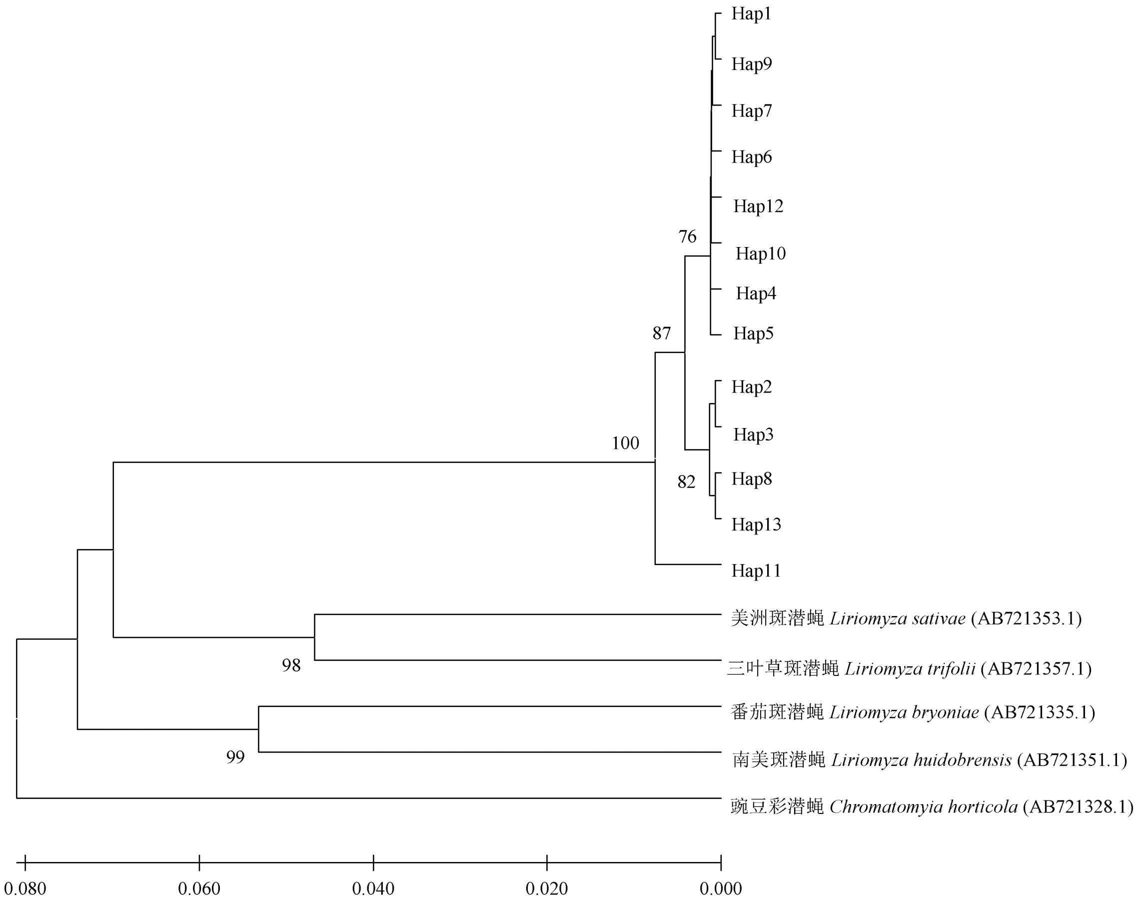


图 1　UPGMA 法构建的基于 mtCOI 基因序列的葱斑潜蝇地理种群及近缘种的单倍型系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic tree of haplotypes of *Liriomyza chinensis* geographical populations and related species constructed by UPGMA method based on mtCOI gene sequence

Hap1 – Hap13：单倍型 Haplotypes.

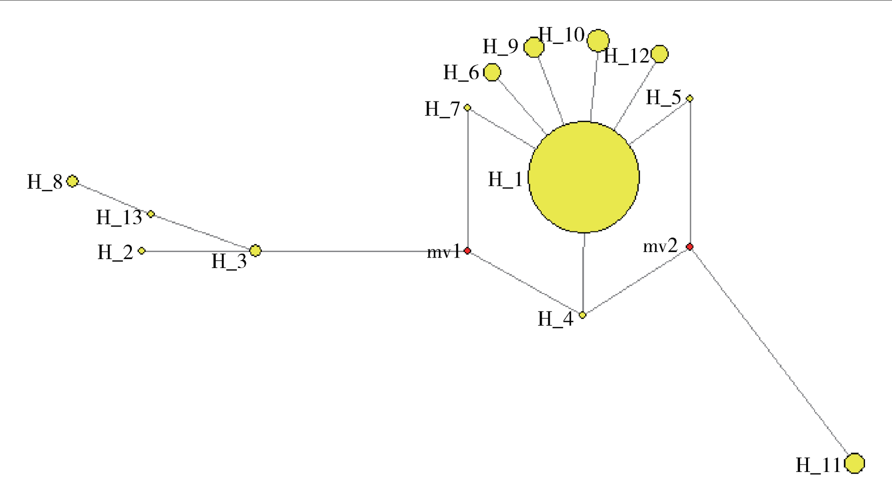


图 2　葱斑潜蝇地理种群 mtCOI 基因单倍型中介网络关系图

Fig. 2　Median-joining haplotype network of *Liriomyza chinensis* geographical populations based on mtCOI gene sequence

每个圆形表示一种单倍型,圆形面积反映出其单倍型在总群体中的出现频率,H_1 – H_13 分别与单倍型 Hap1 – Hap13 相对应,mv1 和 mv2 表示可能的突变位点。Each circle indicates one haplotype, and the circle size represents the frequency of haplotypes appearing in all populations tested. H_1 – H_13 correspond to haplotype Hap1 – Hap13, respectively, and mv1 and mv2 indicate possible mutation sites.

传分化系数(F_{ST})为 0.06971，符合 $1 \leqslant Nm < 4$，$0.05 < F_{ST} < 0.15$,说明群体间存在中等程度的遗传分化,基因交流较充分(Wright, 1951)。各种群间的 F_{ST} 在 –0.045 ~ 0.191 之间(表 4)。吉林通化种群(JLTH)与甘肃白银种群(GSBY)、海南陵水种群(HNLS)、河北保定种群(HBBD)、山东潍坊种群(SDWF)间的遗传分化程度较大($0.15 \leqslant F_{ST} < 0.25$),同时基因交流较为充分($1 \leqslant Nm < 4$)(表 4)。

对供试葱斑潜蝇种群进行的分子方差分析(AMOVA)结果(表 5)表明,葱斑潜蝇种群内遗传变异显著($P < 0.05$),占总变异的 93.23%,说明遗传变异主要来自于种群内部;种群间遗传变异水平低,仅占总变异的 6.97%;不同寄主间($F_{CT} = -0.00485 < 0.05$)表现出较低的遗传分化水平,各寄主植物间的遗传变异不明显($P > 0.05$);同一寄主不同地理种群间($F_{SC} = 0.07216$)表现出中等程度的遗传分化,遗传变异显著($P < 0.05$)。

对所有种群进行 Mantel 检验,发现遗传距离与地理距离之间不存在显著的相关性($r = 0.3820$, $P > 0.05$)(图 3)。

表 4　葱斑潜蝇成对种群间遗传分化系数(F_{ST},下三角)与种群间的基因流(Nm,上三角)

Table 4　Pairwise genetic differentiation coefficient (F_{ST}, below the diagonal) and gene flow (Nm, above the diagonal) between geographical populations of *Liriomyza chinensis*

种群 Population	JLTH	BJHD	NMWH	HBBD	HBSJZ	SDWF	SDYT	SDJN	SDLY	GSBY	HNXC	HNLS
JLTH		4.381	4.720	2.557	3.708	2.507	3.596	3.514	5.044	2.606	9.192	2.122
BJHD	0.102		inf	11.351	67.200	11.500	33.770	inf	22.050	21.589	16.157	8.281
NMWH	0.096	–0.005		inf	180.000	inf	inf	inf	inf	inf	32.991	23.817
HBBD	0.164	0.042	0.000		9.000	inf	inf	inf	20.083	inf	7.460	7.075
HBSJZ	0.119	0.007	0.003	0.053		21.832	34.547	inf	inf	10.184	13.031	6.632
SDWF	0.166	0.042	–0.041	–0.002	0.022		inf	inf	113.546	inf	7.273	7.858
SDYT	0.122	0.015	–0.045	–0.010	0.014	–0.014		inf	inf	inf	23.983	17.340
SDJN	0.125	–0.029	–0.040	0.000	–0.015	–0.010	–0.011		inf	inf	13.214	320.178
SDLY	0.090	0.022	–0.020	0.024	–0.015	0.004	–0.032	–0.004		31.680	44.078	9.274
GSBY	0.161	0.023	–0.043	–0.006	0.047	–0.001	–0.016	–0.006	0.016		8.405	8.426
HNXC	0.052	0.030	0.015	0.063	0.037	0.064	0.020	0.036	0.011	0.056		5.445
HNLS	0.191	0.057	0.021	0.066	0.070	0.060	0.028	0.002	0.051	0.056	0.084	

inf: 无限大 Infinite.

表 5 基于 mtCOI 基因的葱斑潜蝇种群间分子方差分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) within and among populations of *Liriomyza chinensis* based on mtCOI gene

变异来源 Source of variation	自由度 *d.f.*	平方和 Sum of squares	方差组成 Variance components	变异百分比 Percentage of variation	固定系数 Fixation index
种群间 Among populations	11	16.030	0.042*Va*	6.97	
寄主植物间 Among host plant species	1	1.156	-0.00295*Va*	-0.49	F_{CT} = -0.00485, $P>0.05$
寄主内地理种群间 Among geographic populations within host plant species	10	14.874	0.04403*Vb*	7.25	F_{SC} = 0.07216, $P<0.05$
种群内 Within population	241	136.444	0.56616*Vc*	93.23	F_{ST} = 0.06766, $P<0.05$

Va, *Vb*, *Vc*: 分别表示方差组分的数量 Number of variance components; F_{CT}: 寄主种群间变异 Variation among host populations; F_{SC}: 寄主种群内变异 Variation within host populations; F_{ST}: 种群内变异 Variation within a population.

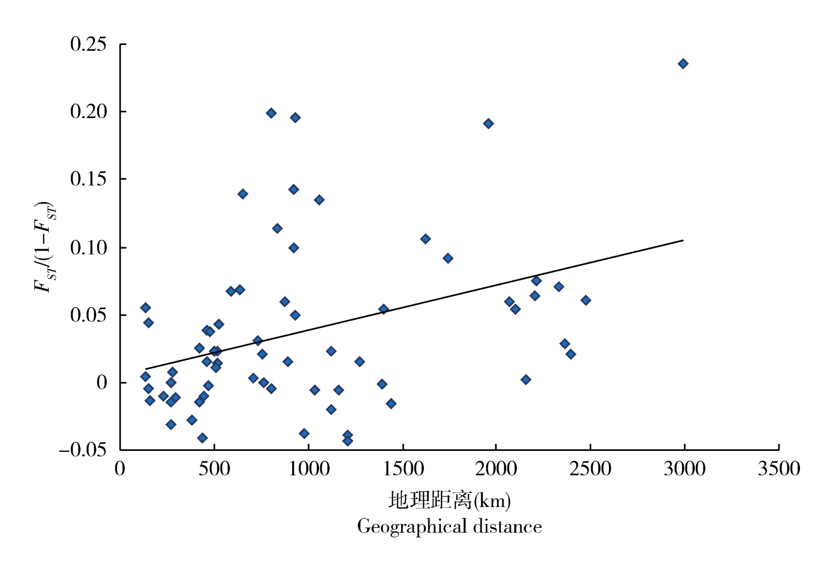


图 3 葱斑潜蝇 12 个地理种群间遗传距离与地理距离的相关性

Fig. 3 Correlation between the genetic distance and the geographical distance for 12 geographical populations of *Liriomyza chinensis*

$F_{ST}/(1-F_{ST})$表示遗传距离。The genetic distance is expressed as $F_{ST}/(1-F_{ST})$.

3 讨论

线粒体 DNA(mtDNA)是常用的分子遗传标记,其中的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(COI)基因在昆虫种类鉴定、隐存种的发现、种群遗传多样性、物种的系统进化等研究方面均得到广泛应用(DeSalle *et al*., 1987; 成新跃等, 2000; Hebert *et al*., 2003; 何恒果, 2008; Norgate *et al*., 2009; Ye *et al*., 2018)。基于 mtCOI 基因,本研究对我国 8 个省/直辖市的 12 个不同地区的葱斑潜蝇种群的遗传多样性、遗传分化程度、基因交流等进行了深入分析。

本研究结果表明,葱斑潜蝇 mtDNA COI 基因序列片段的碱基组成表现较强的 A/T 偏倚性,与典型的昆虫线粒体碱基组成特点(Simon *et al*., 1994; Wang *et al*., 2014; Chen *et al*., 2018)相符。在 12 个地理种群中共定义了 13 个单倍型,包括 7 个共享单倍型和 6 个独享单倍型,说明不同地理区域的葱斑潜蝇在保持着稳定遗传变异的同时,也产生了适应特定地区环境的遗传变异。在 7 个共享单倍型中,单倍型 Hap1 在所有地理种群中均有分布且出现频率最高,同时结合单倍型网络结构图来看,可认为单倍型 Hap1 为葱斑潜蝇群体中适应性较强并广泛分布的原始单倍型。

本研究中葱斑潜蝇总群体的单倍型多样性较低(表 2)。有研究报道,地理距离、寄主植物种类以及生境等是影响昆虫的种群遗传多样性和遗传结构的重要因素(Morgan *et al*., 2000; Scheffer and Lewis, 2006; Tuda *et al*., 2014)。而本研究 Mantel 检验结果显示,地理距离与葱斑潜蝇的遗传距离间没有相

关性，即地理距离并不影响葱斑潜蝇的遗传分化（图 3）。从寄主植物的角度来讲，葱斑潜蝇是寡食性昆虫，仅取食百合科葱属，且主要寄主植物为大葱、小葱，在其他植物上少见发生，种类单一的寄主植物可能在一定程度上限制了葱斑潜蝇种群的遗传分化。在 12 个地理种群中，仅吉林通化种群的单倍型多样性表现较高（$Hd = 0.763$）（表 2）。结合采样地特征分析其原因，吉林通化的葱斑潜蝇为农家自留地采集，与商业化大规模种植的葱相比，化学农药的使用量较少，较低的药剂选择压力可能增加了葱斑潜蝇的遗传变异。总的来说，作者认为葱斑潜蝇在吉林通化可能受到人工选择压力较小以及其他原因，造成了其较高的遗传多样性。

遗传分化系数（F_{ST}）和基因流（Nm）是研究种群遗传分化的重要参数，可以解释影响种群发生遗传分化的因素（Rousset, 1997）。Tajima's *D* 检验可揭示物种在一定历史时期内的种群动态等情况，通过检验值来判断种群是否存在扩张及瓶颈效应（Tajima, 1989）。在本研究中，葱斑潜蝇总群体的遗传分化系数（F_{ST}）为 0.06971（$0.05 < F_{ST} < 0.15$），遗传分化程度达到中等水平，遗传变异主要来自于种群内；基因流水平（Nm）为 3.33629（$1 \leq Nm < 4$），群体交流较为充分（表 4），说明葱斑潜蝇有某种渠道可以进行基因交流。基因交流水平可能与昆虫自身的迁徙能力、交通运输、气流扩散等因素密切相关。而斑潜蝇属害虫普遍飞行能力较弱，据报道，美洲斑潜蝇平均飞行距离仅为 0.95 km（雷仲仁等, 2002）。葱斑潜蝇与美洲斑潜蝇体型相近，为非迁飞性害虫，故而推测葱斑潜蝇通过飞行进行不同地区基因交流的可能性较小。随着物流行业的发展，交通运输也逐渐成为昆虫进行长距离基因交流的一种重要途径（Tuda *et al.*, 2014）。葱斑潜蝇危害的主要寄主植物是大葱，而我国的大葱种植主要集中在山东、河北、河南所在的第一大主产区，频繁的交通运输可能是葱斑潜蝇群体基因交流较充分的重要原因，而葱斑潜蝇是否存在气流扩散方式，这方面的研究还未有报道。中性检验结果表明，葱斑潜蝇总群体在较近的历史时期内未经历明显的种群扩张或种群增长，总群体保持稳定状态。

本研究仅以 mtDNA COI 基因长为 759 bp 的单个片段作为分子遗传标记，为研究葱斑潜蝇的系统进化等提供了基础性遗传资料。本研究发现葱斑潜蝇的遗传多样性水平低，后续还需要增加不同生境类型、寄主植物种类、虫源采集量等数据，才能更深层次地系统阐析不同地理区域葱斑潜蝇的遗传分化。

参考文献（References）

Chen JY, Chang YW, Zheng SZ, Lu MX, Du YZ, 2018. Comparative analysis of the *Liriomyza chinensis* mitochondrial genome with other agromyzids reveals conserved genome features. *Sci. Rep.*, 8(1): 1-10.

Cheng XY, Zhou HZ, Zhang GH, 2000. Application of molecular biology techniques in insect systematics. *Acta Zootaxon. Sin.*, 25(2): 121-133. [成新跃, 周红章, 张广学, 2000. 分子生物学技术在昆虫系统学研究中的应用. 动物分类学报, 25(2): 121-133]

De Barro PJ, Driver F, 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.*, 36(2): 149-152.

DeSalle R, Freedman T, Prager EM, Wilson AC, 1987. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, 26(1-2): 157-164.

Excoffier L, Lischer HEL, 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10(3): 564-567.

Fu SY, Su BL, 2011. The occurrence characteristic and control technique of *Liriomyza chinensis* on *Allium fistulosum* exportation. In: Plant Protection Science and Technology Innovation and Pest Control Professional - Proceedings of 2011 Annual Meeting of China Society of Plant Protection. China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 615-618. [傅苏友, 苏保乐, 2011. 葱斑潜蝇在出口大葱上的发生规律及防治技术研究. 见: 植保科技创新与病虫防控专业化——中国植物保护学会 2011 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社. 615-618]

He HG, 2008. Application of molecular marker technology in insect population genetics. *J. China West Norm. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 29(4): 342-347. [何恒果, 2008. 分子标记技术在昆虫种群遗传学研究中的应用. 西华师范大学学报(自然科学版), 29(4): 342-347]

Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.*, 270(Suppl 1): S96-S99.

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132(2): 583-589.

Kang L, 1996. Ecology and Continuous Control of *Liriomyza* Species (Diptera: Agromyzidae). Science Press, Beijing. 215 pp. [康乐, 1996. 斑潜蝇的生态学与持续控制. 北京: 科学出版社. 215 页]

Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 33(7): 1870-1874.

Lei ZR, Wang Y, Huang DR, Cheng DF, 2002. Influence of temperature on flight potential of *Liriomyza sativae* Blanchard. *Acta Entomol. Sin.*, 45(3): 413-415. [雷仲仁, 王音, 黄冬如, 程

登发, 2002. 美洲斑潜蝇在不同温度下的飞行能力. 昆虫学报, 45(3): 413 –415]

Liang CF, Meng X, Ju YR, Hu ZD, 2018. Occurrence and control of *Liriomyza chinensis* on Chinese leek. *Northwest Hortic.*, 257(6): 53 –54. [梁超峰, 蒙星, 巨亚绒, 胡作栋, 2018. 葱斑潜蝇在大葱上的发生与防治. 西北园艺, 257(6): 53 –54]

Martynov VV, Nikulina TV, Gubin AI, 2016. Range expansion of invasive stone leek leafminer *Liriomyza chinensis* (Kato, 1949) (Diptera: Agromyzidae) in Eastern Europe. *Euroasian Entomol. J.*, 15(5): 420 –421.

Miller MP, 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. http://www.marksgeneticsoftware.net/.

Morgan DJW, Reitz SR, Atkinson PW, Trumble JT, 2000. The resolution of Californian populations of *Liriomyza huidobrensis* and *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) using PCR. *Heredity*, 85 (Pt 1)(1): 53 –61.

Norgate M, Chamings J, Pavlova A, Bull JK, Murray ND, Sunnucks P, 2009. Mitochondrial DNA indicates late pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. *PLoS ONE*, 4(11): e7950.

Pan XM, Jiang GH, 2001. A study on bionomics of *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agrornyzidae). *Entomol. Knowl.*, 38(5): 366 – 371. [潘秀美, 姜官恒, 2001. 葱斑潜蝇生物学特性研究. 昆虫知识, 38(5): 366 –371]

Pan XM, Jiang GH, Li FM, 2000. Occurrence regularity and control study of *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agromyzidae). *Shandong Agric. Sci.*, (1): 36 –38. [潘秀美, 姜官恒, 李法孟, 2000. 葱斑潜蝇发生规律及防治研究. 山东农业科学, (1): 36 –38]

Peng S, Yang Y, Chen L, Jiang ZP, 2017. Analysis on planting and mechanized harvesting of welsh onion. *J. Chin. Agric. Mech.*, 38 (9): 30 –35. [彭帅, 杨勇, 陈龙, 江志鹏, 2017. 大葱种植与机械化收获分析. 中国农机化学报, 38(9): 30 –35]

Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145(4): 1219 – 1228.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A, 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Mol. Biol. Evol.*, 34(12): 3299 –3302.

Scheffer SJ, Lewis ML, 2006. Mitochondrial phylogeography of the vegetable pest *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae): diverged clades and invasive populations. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 99(6): 991 –998.

Shiao SF, 2004. Morphological diagnosis of six *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) of quarantine importance in Taiwan. *Appl. Entomol. Zool.*, 39(1): 27 –39.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6): 651 –701.

Spencer KA, 1973. Agromyzidae (Diptera) of economic importance. *Ser. Entomol.*, 9: 4051.

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585 –595.

Tran DH, Ridland PM, Takagi M, 2007. Effects of temperature on the immature development of the stone leek leafminer *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agromyzidae). *Environ. Entomol.*, 36(1): 40 –45.

Tran DH, Takagi M, 2005. Developmental biology of *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agrornyzidae) on onion. *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 50(2): 375 –382.

Tuda M, Kagoshima K, Toquenaga Y, Arnqvist G, 2014. Global genetic differentiation in a cosmopolitan pest of stored beans: effects of geography, host-plant usage and anthropogenic factors. *PLoS ONE*, 9(9): e106268.

Wang JZ, Sun SL, Su HT, 2000. Occurrence and control measures of *Liriomyza species* (Diptera: Agromyzidae) in China. *J. Beijing Agric. Coll.*, 15(1): 74 –80. [王进忠, 孙淑玲, 苏红田, 2000. 我国斑潜蝇的发生危害及其防治对策. 北京农学院学报, 15 (1): 74 –80]

Wang LP, Du YZ, He YT, Lu YJ, Lu ZQ, 2007. Sequence analysis and comparison of rDNA-ITS1 of geographical populations of *Liriomyza sativae* Blanchard (Diptera: Agromyzidae) from China and closely related species. *Acta Entomol. Sin.*, 50(6): 597 – 603. [王莉萍, 杜予州, 何娅婷, 陆亚娟, 陆自强, 2007. 不同地理种群美洲斑潜蝇及近缘种的 rDNA-ITS1 序列分析和比较. 昆虫学报, 50(6): 597 –603]

Wang LX, Zhang YJ, Jiang YW, 2000. Bionomics of *Liriomyza chinensis* (Kato). *Entomol. Knowl.*, 37(4): 214 –217. [王立霞, 张永军, 蒋玉文, 2000. 葱斑潜蝇的生物学特性. 昆虫知识, 37(4): 214 –217]

Wang SY, Lei ZR, Wen JZ, Wang HH, Li X, Dong BX, Ren BZ, 2014. The complete mitochondrial genome of *Liriomyza huidobrensis* and comparison with *L. trifolii* and *L. sativae* (Diptera: Agromyzidae). *Mitochondr. DNA*, 25(2): 104 –105.

Wang YW, Liu XH, Li QX, Cheng JC, 1992. Preliminary report on the study of leek leaf fly. *Xinjiang Farm Res. Sci. Technol.*, (1): 22 – 23. [王永卫, 刘秀华, 李清西, 程静婵, 1992. 葱斑潜叶蝇研究初报. 新疆农垦科技, (1): 22 –23]

Wei GX, Wang ZW, Li WY, 2001. Occurrence and prevention of the damage of the latent fly of *Liriomyza chinensis* (Diptera: Agrornyzidae). *Plant Prot.*, 27(5): 53. [魏国先, 王忠武, 李文羽, 2001. 葱斑潜蝇发生危害与防治. 植物保护, 27(5): 53]

Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Nature*, 15(4): 323 –354.

Ye FY, Zhu CD, Yefremova Z, Liu WX, Guo JY, Wan FH, 2018. Life history and biocontrol potential of the first female-producing parthenogenetic species of *Diglyphus* (Hymenoptera: Eulophidae) against agromyzid leafminers. *Sci. Rep.*, 8(1): 3222.

(责任编辑: 马丽萍)